

Abstract of the doctoral thesis

Molecular breeding of *Cupriavidus necator* for industrial
production of biodegradable biopolymer
poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate)

Graduate School of Natural Science and Technology

Kanazawa University

Division of material science

Student ID Number: 1123132306

Shunsuke Sato

Abstract

The aim of this study is development of industrially applicable production technology of biodegradable and biomass polyester poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) (PHBH) with more than 10 mol% of 3HH monomer fraction from palm kernel oil as a sole carbon source. I successfully developed the process by breeding a recombinant strain of *Cupriavidus necator* H16 in which *phaA* encoding acetoacetyl-CoA acetyltransferase is deactivated and crotonyl-CoA reductase (CCR) of *Streptomyces cinnamomensis* and PHA synthase of *Aeromonas caviae* (PhaC_{Ac}NSDG) are expressed in order to increase 3HH monomer content. I found that BktB (a second β -ketothiolase with broader substrate specificity) condenses acetyl-CoA and butyryl-CoA effectively to synthesize 3-ketohexanoyl-CoA (a precursor of 3HH monomer) only in the *phaA* deactivated mutant. Moreover, it was proved that the CCR works for increase intracellular (*R*)-3HH-CoA provision and activity of PHA synthase is important in efficiency of incorporation of that (*R*)-3HH-CoA into PHBH. By expressing the *ccr_{Sc}* and *phaC_{Ac}NSDG* genes, newly constructed stable expression vector (pCUP3) was very useful. Consequently, production of PHBH by 135 gPHBH/L of productivity and 12.2 mol% of 3HH monomer fraction after 65 h of cultivation time was achieved.

学位論文要旨

再生可能資源から生産されるバイオプラスチックは、貴重な石油資源の浪費抑制や、近年の気候変動の原因のひとつとされる温暖化ガス排出抑制、また、埋め立てや不法投棄による土壌汚染、野生動物の誤飲による死亡などの諸問題を解決する素材として近年急速に市場が拡大している。poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBH) は微生物が合成する polyhydroxyalkanoate の一種であり、(R)-3-hydroxybutyrate (3HB)、及び (R)-3-hydroxyhexanoate (3HH) からなる生分解バイオマスプラスチックである (Fig. 1)。この PHBH は 3HH 組成が高いほど結晶性が低下、引っ張り破断伸び向上し、柔軟性を示す (Fig. 2)。このような特徴から、ポリエチレンやポリプロピレンといった石油由来のプラスチックの代替としてその量産化が期待されている。本研究では柔軟性を有する PHBH (3HH 組成が 10mol%以上) をパーム核油 (PKO) から量産する技術を開発することを目的とした。

生産に使用する微生物としては poly(3-hydroxybutyrate) 高生産株として知られている *Cupriavidus necator* H16 株を選択した。*C. necator* は非 PHBH 生産株であり、遺伝子操作により PHBH 合成能を付与する必要があるが、従来使用されてきた宿主-ベクター系は PHBH 高蓄積条件にてプラスミドベクターの安定性が著しく低いことが明らかとなった。このため、まず、遺伝子組み換え系の開発を行った。検討の結果、*Cupriavidus metallidurans* CH34 株が保有するメガプラスミド pMOL28 にコードされているプラスミド分配に関与する遺伝子領域(par 領域)、及び、プラスミド複製起点を用いることで、PHBH 高生産条件(MBN 培地)にて従来の pJRD 系プラスミドベクターと比較して高度に安定維持されるプラスミドベクター(pCUP3)を開発することに成功した (Fig. 3, 4)。

一方、*Aeromonas caviae* 由来 PHA 合成酵素遺伝子を *C. necator* の PHA 合成酵素遺伝子(*phaCI*)座に入れ替える形で染色体導入した株(KNK005)を育種した結果、高い生産性(134g_{PHBH}/L)を示すものの 3HH 組成は 7.2mol%と低位であった。そこで、3HH 組成を向上させる技術開発を行った。原料となる PKO の構成成分である脂肪酸は β -酸化経路によって acetoacetyl-CoA へと分解され、さらにこの

acetyl-CoA は acetoacetyl-CoA、3HB-CoA へと変換される。また、 β -酸化経路の中間物質である 2-hexenoyl-CoA、及び 3-ketohexanoyl-CoA はそれぞれ水酸化、還元反応によって 3HH-CoA へと変換され、さらに、これら 3HB-CoA, 3HH-CoA は PHA 合成酵素によって PHBH へと重合される (Fig. 5)。3HH 組成を向上させるためには、3HH の供給量を増加させることが必要と考えた。

そこで、培地中に酪酸を添加することで、BktB (β -ketothiolase) が触媒する acetyl-CoA と Butyryl-CoA から 3-ketohexanoyl-CoA を合成する縮合反応によって 3-ketohexanoyl-CoA の供給量を増加させる方法を試みた。しかしながら、添加した酪酸は効率的に 3HH へと変換されず、実際には 3HH 組成は低下する結果となった。この原因として別の β -ketothiolase (PhaA) が触媒する Acetyl-CoA の 2 量化経路により、3-ketohexanoyl-CoA への代謝流量が低下していることが推測された。そこで *phaA* を不活性化したところ (AS 株)、酪酸の添加による 3HH 組成の向上に成功した。さらには、pCUP3 による BktB の高発現 (ASBK 株) によって酪酸添加効果が向上することも明らかとなった (Fig. 6)。

酪酸の添加による Butyryl-CoA の供給、及び、*phaA* 遺伝子の不活性化により 3HH 組成の高い PHBH の生産に成功したものの、高価な酪酸を添加することは経済的に工業生産には不適合であることから、酪酸を利用せずに Butyryl-CoA 供給量を高める方法を開発する必要がある。そこで、 β -酸化経路によって生成した crotonyl-CoA を crotonyl-CoA 還元酵素 (CCR) によって再還元することで細胞内 butyryl-CoA 濃度を高め、acetyl-CoA と butyryl-CoA の縮合反応を促進させることを目的とし、*Streptomyces cinnamomensis* 由来 crotonyl-CoA 還元酵素 (*ccr_{Sc}*) を pCUP3 にて導入した (ASCR 株) (Fig. 7)。その結果、PKO のみから 3HH 組成約 10mol% の PHBH を 131.7gPHBH/L の生産性にて蓄積させることに成功した (Table 1)。

しかしながら、3HH 組成 10mol% はその物性 (引っ張り破断伸び率) が不安定であることが明らかになったため、安定生産の観点から、さらに 3HH 組成を高める必要があった。CCR の高発現は菌体の生育を抑制する傾向が確認されたため、異なる方法による 3HH 組成の向上技術開発を行った。その結果、染色体に

組み込まれている PHA 合成酵素遺伝子と同じ遺伝子を pCUP3 によって導入することで複コピー化し、PHA 合成酵素活性を上昇させることで 3HH 組成を上昇させることを見いだした。最終育種株(ASCRN 株)において PKO のみから 135g_{PHBH}/L の生産性にて、12.2mol%の 3HH 組成の PHBH を蓄積させることに成功した (Table 1, Fig. 8)。また、これらの結果により、本菌株による PHBH 生産において、3HH 組成は 3HB-CoA、及び 3HH-CoA の供給量のみならず、それらモノマーの合成酵素による取り込み、及び、重合過程の影響も受けていることが示唆された。

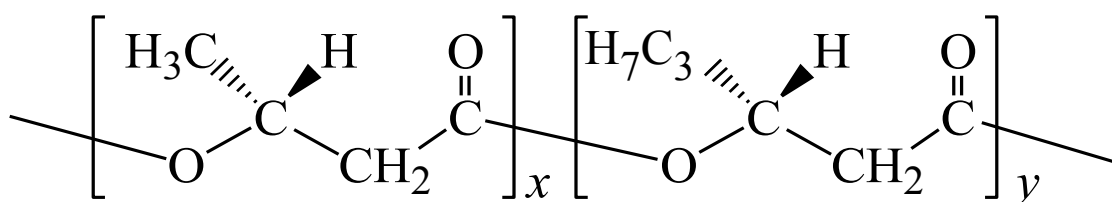


Fig. 1. Structure of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)

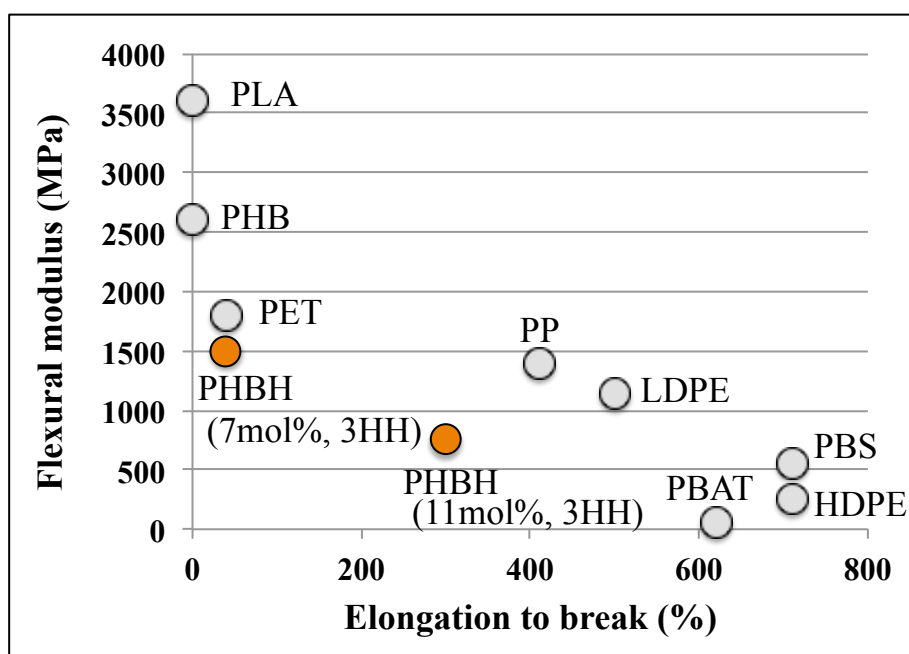


Fig. 2. Modulus vs. Elongation of various polymers

PP; polypropylene. LDPE; low density polyethylene. HDPE; high density polyethylene.

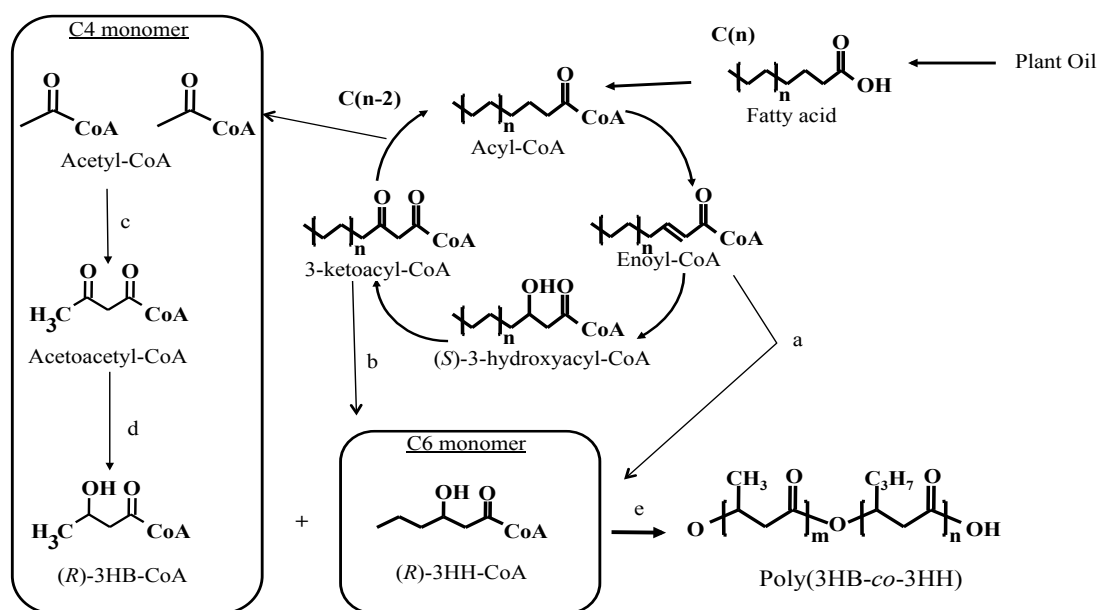


Fig. 5. PHBH synthesis pathway in recombinant *Cupriavidus necator* H16 from plant oils (or fatty acids). a; (*R*)-specific enoyl-CoA hydratase (encoded in *phaJ*). b, d; NADPH dependent (*R*)-specific reductase (encoded by *phaB*), c; acetoacetyl-CoA acetyltransferase (encoded in *phaA*). e; PHA synthase (encoded in *phaC_{Ac}*)

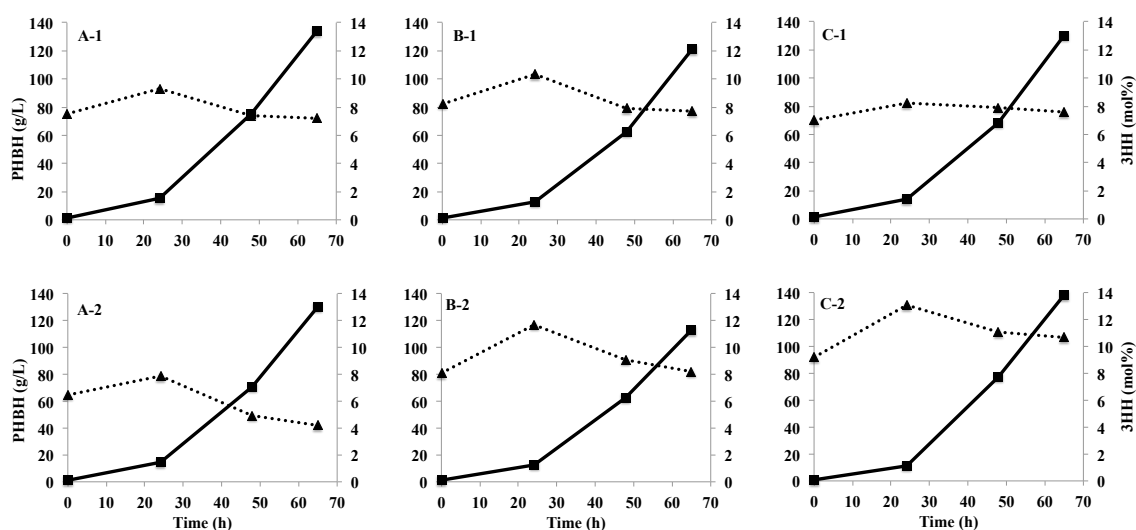


Fig. 6. Time course of PHA productivity (solid squares) and 3HH composition (solid triangles) of recombinant *Cupriavidus necator* strains cultured under high cell density fed-batch fermentation conditions.

1; PKO, 2; Butyrate/PKO = 16.7/83.3 (wt/wt). A; KNK005, B; AS, C; ASBK.

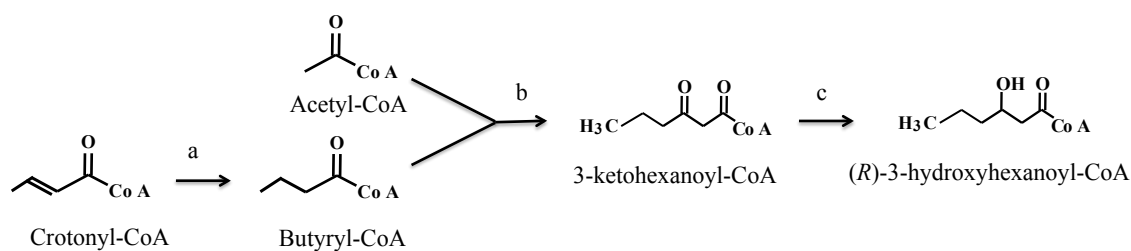


Fig. 7. Pathway for biosynthesis of (R)-3-hydroxyhexanoyl-CoA from crotonyl-CoA .

a; Crotonyl-CoA reductase (CCR_{Sc}), b; β -ketothiolase (BktB),

c; (R)-specific reductase (PhaB).

Table 1. Results of high cell density PHA fermentation using *C. necator* strains.

strain	plamid	DCW (g/L)	PHA (g/L)	PHA content (wt%)	Composition (mol%)	
					3HB	3HH
KNK005	none	173.6 \pm 2.2	133.7 \pm 3.6	77.0 \pm 1.1	92.6 \pm 0.3	7.5 \pm 0.3
KNK005CN	pCUPEE $ccr::NSDG$	181.5 \pm 1.4	148.0 \pm 1.5	81.6 \pm 0.2	92.0 \pm 0.2	8.1 \pm 0.2
ASCR	pCUP3EE ccr	171.0 \pm 2.1	131.7 \pm 1.3	77.1 \pm 1.7	90.2 \pm 0.1	9.9 \pm 0.1
ASCRN	pCUPEE $ccr::NSDG$	173.0 \pm 2.9	135.1 \pm 5.2	78.1 \pm 1.7	87.8 \pm 0.3	12.2 \pm 0.3

Cells were cultivated in MBN medium. In culture, PKO was intermittently added.

Antibiotics, such as kanamycin, were not added at all levels of the culture.

All values represent means of duplicate cultures, with the uncertainties indicating the range of observed values.

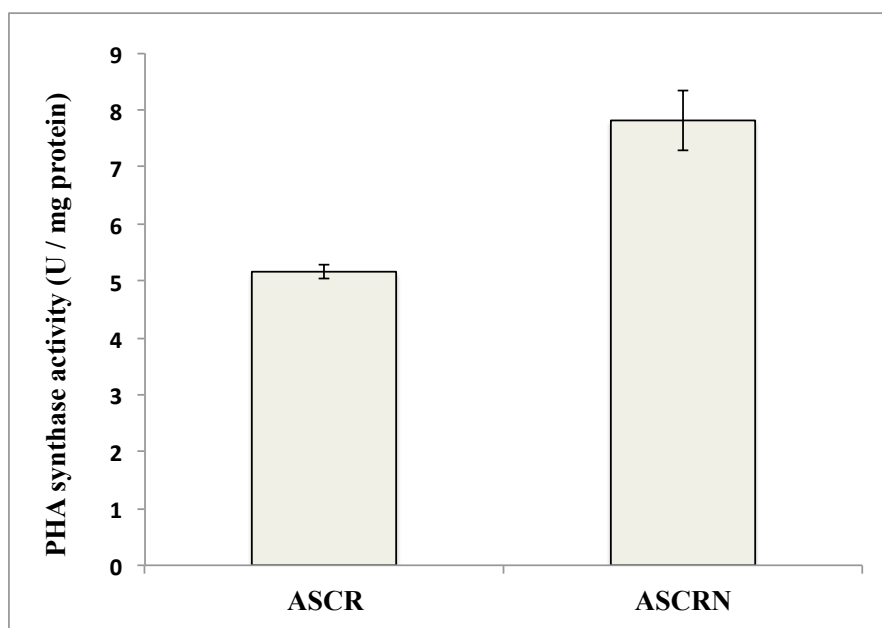


Fig. 8. PHBH synthase activity of ASCR and ASCRN strains.

平成²⁷年 2月 3 日

学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

Molecular breeding of *Cupriavidus necator* for industrial production of biodegradable biopolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)

（生分解性バイオポリマーPoly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)の工業生産に向けた *Cupriavidus necator* の分子育種）

2. 論文提出者 (1) 所 属 物質科学専攻 エコサイクルシステム講座

(2) 氏 名 佐藤 俊輔

3. 審査結果の要旨（600～650 字）

提出学位論文について各審査委員の個別審査後、平成 26 年 12 月 22 日に予備審査会を実施するとともに、平成 27 年 2 月 2 日に口頭発表会と論文審査委員会を開催し、以下のように判定した。生分解性プラスチックである poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBH) は 3-hydroxyhexanoate (3HH) 組成が 10 mol% を超えると 200% 以上の引っ張り破断伸びを示すことから、ポリエチレンやポリプロピレンなどの代替が期待されている。本論文は PHBH の工業生産を目指し、3HH 組成が 10 mol% 以上の軟質 PHBH を安定、高生産可能な菌株の育種を試みた。*Cupriavidus metallidurans* 由来のメガプラスミドにコードされている *parAB* 遺伝子、*parC*、*OriV* 領域を導入したプラスミドベクターを利用することで、Poly(3-hydroxybutyrate) 高生産菌である *C. necator* に PHBH を高生産 (134 g/L) させることが可能となった。一方 PHBH 合成酵素遺伝子の導入のみでは 3HH 組成は 7.2 mol% に留まることも明らかとなった。3HH 組成の向上には、 β -ketothiolase による butyryl-CoA と acetyl-CoA の縮合反応、さらにパーム核油の代謝中間体である crotonyl-CoA の crotonyl-CoA reductase による還元が効果的であることを明らかとし、パーム核油のみから 10 mol% 程度の 3HH 組成を有する PHBH の高生産に成功した。さらに PHBH 合成酵素活性を上昇させることで 3HH モノマーの PHBH への取り込み効率を向上させることに成功し、最終的に 12.2 mol% の 3HH 組成を有する PHBH の高生産 (135 g/L) に成功した。以上の結果は、学術面のみならず生分解性プラスチックの工業化に大きく貢献出来るものである。よって、これらの成果は博士（工学）の学位を与えるに十分なものであると判定した。

4. 審査結果 (1) 判 定 (いずれかに○印) 合 格 ・ 不合格

(2) 授与学位 博 士 (工 学)